

مقایسه اندکس حاصل از رنگ آمیزی AgNOR در توده‌های بدخیم و خوش خیم

پستانی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان حضرت رسول اکرم(ص)

چکیده

نواحی سامانگر هستک (NOR=nucleolar organizer regions) حلقه‌هایی از DNA حاوی ژنهای ریبوزومی هستند که RNA ریبوزومی، جهت پروتئین‌سازی، از روی آن ترجمه می‌شود. نواحی سامانگر هستک (NOR) در بازوی کوتاه کروموزومهای آکروسانتريک قرار دارند و حاوی پروتئینهای نقره‌دوست می‌باشند که در رنگ‌آمیزی کلئید نقره به صورت نقاط سیاه‌رنگی به نام AgNOR مشاهده می‌شوند. تعداد AgNORها در هسته با میزان فعالیت تکثیری سلولی ارتباط مستقیم دارد. هر چه تعداد AgNOR بیشتر باشد، میزان فعالیت تکثیری آن بافت بیشتر است و احتمال بدخیم بودن آن نیز بیشتر می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی ارزشمند بودن AgNOR در افتراق توده‌های خوش‌خیم از توده‌های بدخیم پستانی است تا با استفاده از این رنگ‌آمیزی، از روی نمونه‌های کوچک بیوپسی، FNA، Touch imprint، Frozen section، براحتی بتوانیم توده‌های خوش‌خیم را از بدخیم افتراق دهیم. در این مطالعه رنگ‌آمیزی AgNOR روی ۹۰ مقطع حاصل از برش بلوکهای پارافینی شامل ۴۵ مورد توده خوش‌خیم و ۴۵ مورد توده بدخیم انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که تعداد متوسط NOR رنگ شده توسط نقره (AgNOR)، در هر سلول از تومورهای خوش‌خیم پستان ۴/۱۳ و در تومورهای بدخیم ۹/۸۲ است. با استفاده از t-test و oneway ANOVA test تفاوت آماری معنی‌داری بین متوسط AgNOR (Mean) توده‌های بدخیم و توده‌های خوش‌خیم پستانی وجود داشت بنابراین رنگ‌آمیزی AgNOR می‌تواند روشی ساده، مطمئن و کم هزینه جهت افتراق توده‌های خوش‌خیم از توده‌های بدخیم پستانی باشد.

*دکتر مریم کدیور I

دکتر علی محمد شفیعی II

کلیدواژه‌ها: ۱- نواحی سامانگر هستک (NOR) ۲- روش رنگ‌آمیزی کلئید نقره

۳- ضایعات خوش‌خیم پستان ۴- ضایعات بدخیم پستان

مقدمه

دارد که حاوی پروتئینهای نقره‌دوست مثل نوکلئولین، RNA پلی‌مران I، پروتئین B23 و دیگر پروتئینهای غیرهستونی اسیدی می‌باشند. با رنگ‌آمیزی نقره این پروتئینها رنگ سیاه به خود می‌گیرند (black dot). اهمیت پژوهش: سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان و امروزه بعد از سرطان ریه شایع‌ترین علت مرگ در اثر سرطان در زنان می‌باشد (۱، ۲ و ۳).

AgNOR از ۲ بخش Ag که علامت اختصاری نقره (Silver) است و NOR که مخفف Nucleolar Organizer Regions می‌باشد، تشکیل شده است. NOR مناطقی از مارپیچهای DNA و حاوی ژنهای ریبوزومی است که از روی آنها rRNA ترجمه شده و سبب پروتئین‌سازی می‌شود. NOR در بازوی کوتاه کروموزومهای آکروسانتريک ۱۳-۱۴-۱۵-۲۱-۲۲ وجود

این مقاله خلاصه‌ایست از پایان نامه دکتر علی محمد شفیعی جهت اخذ مدرک دکترای تخصصی پاتولوژی به راهنمایی خانم دکتر مریم کدیور، سال ۱۳۸۰.

(I) استادیار گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران (*مؤلف مسؤول)

(II) دستیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران.

در این تحقیق سعی شد تا بر اساس رنگ آمیزی NOR و شمارش آن در هسته تومورهای خوش خیم و بدخیم، معیاری جهت تفکیک ظاهری این ضایعات تعیین گردد تا از بروز اختلاف نظر پیرامون تشخیص صحیح در ضایعات مزبور جلوگیری شود.

آیا رنگ آمیزی AgNOR توانایی افتراق توده های بدخیم از توده های خوش خیم پستانی را دارد؟

بررسی پیشینه پژوهش: اولین بار در سال ۱۹۸۸ آقایان Crocker و Smith، رنگ آمیزی AgNOR را در ۲۰۰ مورد کارسینوم پستان مورد بحث قرار دادند و اندکس AgNOR را به عنوان یک متغیر، با متغیرهای دیگر مثل سایز سلولی، درجه (grade) هیستولوژیک، تعداد گره های لنفاوی درگیر و متاستاز مقایسه کردند.

آنها نتیجه گرفتند که هر چه اندکس AgNOR بیشتر باشد، سایز سلولی بزرگتر، درجه بافت شناسی بالاتر، تعداد گره های لنفاوی درگیر بیشتر و میزان متاستاز بیشتر می باشد (۵).

Lea-Rath در Acta cytologica رنگ آمیزی AgNOR روی FNA حاصل از ۵۲ مورد بیماری فیبروکیستیک و ۱۵ مورد فیبروآدنوما و ۴۵ مورد کارسینوم را گزارش کردند.

آنها از نظر آماری ($Pvalue < 0.001$) تفاوت واضحی بین ضایعات بدخیم و خوش خیم پستانی یافتند اما بین فیبروآدنوما و بیماری فیبروکیستیک و نیز بین لوبولار کارسینوما و کارسینوم مجرای مهاجم تفاوتی پیدا نکردند (۶).

Subra manian در Journal of surgical oncology مطالعه خود را گزارش کرد که در این مطالعه اندکس AgNOR را در ۲۰۰ بیمار بررسی نمود و نتیجه گرفت که اندکس بالای AgNOR با سایز بزرگ سلول، درجه III تومور و متاستاز همراه می باشد و هر چه مقدار AgNOR در توموری بالاتر باشد میزان بقای بیمار کمتر است (۷).

در ایالات متحده از هر ۹ زن ۱ نفر در طول مدت عمر خود دچار سرطان می شود که ۱/۳ آنها می میرند و بطور کلی سالانه سبب بیش از ۴۴۰۰۰ مورد مرگ می گردد (۲، ۳ و ۴).

اغلب بیماریهای پستانی به صورت توده (Mass) بروز می کنند که در کلینیک، افتراق خوش خیم بودن از بدخیم بودن توده مشکل می باشد.

امروزه نمونه های ارسالی برای آسیب شناس هر روز کوچکتر و کمتر می شود. گذاشتن تشخیص روی نمونه های Frozen section، Touch imprint، FNA و بیوپسی های کوچک بسیار مشکل می باشد.

افتراق ضایعاتی مثل میکروگلاندولار آدنوزیس (MicroGlandular Adenosis) از توبولار کارسینوما (tubular CA) یا آدنوزیس اسکروزان (Sclerosing Adenosis) از کارسینوم مجرای مهاجم (Invasive ductal carcinoma) حتی در نمونه های بزرگ حاصل از لامپکتومی (Lampectomy) یا جراحی رادیکال بسیار مشکل است (۲ و ۳).

بنابراین در نمونه های کوچک ذکر شده احتمال خطا بسیار بالا می رود. تستهای متعدد و پیچیده ای برای حل این مشکل ابداع شده است.

تستهایی مثل فراکسیون S سیکل سلولی با تیمیدین نشاندار، فلوسیتومتری، اندکس میتوز و سیتومتری با تصویبربرداری کامپیوتری، برای ارزیابی میزان فعالیت تکثیر سلولی، میزان تمایز سلولی قدرت تهاجم و در نهایت کمک به تعیین پیش آگهی بیمار، به وجود آمدند.

تمام این روشها نیاز به صرف وقت، هزینه زیاد و نیز تربیت نیروی متخصص دارد، اما رنگ آمیزی AgNOR یک روش کمکی ارزان، سریع و در دسترس است که نیاز به تربیت نیروی متخصص ندارد و آسیب شناس با تکیه بر نتایج حاصل از این رنگ آمیزی با اطمینان خاطر بیشتری می تواند تشخیص را مطرح نماید.

روش بررسی

در این طرح پژوهشی ۹۰ بیمار که با توده پستانی به بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند.

از ۴۵ مورد توده‌های خوش‌خیم، ۲ مورد داکت اکتازی (Duct Ectasia)، ۳ مورد ژنیکوماستی، ۱۹ مورد فیبروآدنوما، ۲۱ مورد بیماری فیبروکیستیک بودند و ۴۵ مورد توده‌های بدخیم و همگی کارسینوم مجرای می‌باشند.

در این روش مقاطعی از بلوکهای پارافینی که قبلاً تشخیص آسیب‌شناسی آنها تعیین و تایید شده بود، توسط میکروتوم با ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. سپس این نمونه‌ها با استفاده از گزیلول، موم‌زدایی (dewax) شدند.

در مرحله بعد به واسطه بور، از ظرف حاوی الکل با درجه خلوص کاهش یا بنده آبدی شده، در ظرف حاوی آب قرار داده شدند و جهت رنگ‌آمیزی آنها از شیوه crocker و همکاران به این شکل استفاده شد:

محلول A: ۵۰ گرم نیترات نقره را در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حل کرده محلول ۵۰٪ نیترات نقره را ساختیم.

محلول B: ۲ گرم پودر ژلاتین را در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حاوی ۱ گرم اسیدفرمیک، در دمای ۶۰ تا ۷۰ درجه حل کردیم.

محلول کار: ۲ حجم محلول A را با یک حجم محلول B مخلوط کردیم (محلول کار بلافاصله بعد از تهیه باید مورد استفاده قرار گیرد).

لامها را به مدت ۳۰ تا ۴۰ دقیقه در محلول کار در محل بدون نور قرار دادیم سپس با آب دیونیزه شستشو دادیم، سپس در محلول غلیظ شونده الکل آب‌گیری کردیم (رنگ‌آمیزی مخالف لازم نیست).

اگر از بلوکهای پارافینی استفاده می‌شود باید مرحله پارافین‌گیری به وسیله گزیلول انجام شود و از حرارت استفاده نگردد. چگونگی شمارش AgNOR: ابتدا اسلایدها را با بزرگنمایی ۴۰ بررسی کردیم و مناطقی را که دارای

کمترین overlap سلولی، رسوب و Airdry بودند، انتخاب کردیم.

لامهایی که ضعیف رنگ شده بودند از مطالعه خارج شدند. AgNOR به صورت نقاط سیاهرنگ داخل هسته دیده شد که به ۲ گروه تقسیم گردید.

Fine AgNOR که نقاط سیاهرنگ هموزن با لبه‌های ظریف مشخص به قطر ۱ تا ۵ میکرون و Coarse AgNOR که نقاط سیاه رنگ خشن درشت به قطر بزرگتر از ۵ میکرون بودند.

بعضی از محققین فقط Coarse AgNOR را شمارش می‌کنند اما بعضی دیگر هر دو را می‌شمارند. در این تحقیق Fine و Coarse AgNOR شمرده شدند.

سپس با بزرگنمایی ۱۰۰ و با روغن ایمرسیون AgNOR در تعداد ۱۰۰ سلول شمرده شد و از این ۱۰۰ عدد میانگین گرفته شد و به عنوان اندکس AgNOR در لام مربوطه ثبت گردید. در طی مطالعه، آسیب‌شناس تشخیص ضایعه را نمی‌دانست.

نتایج

نتایج بدست آمده براساس شمارش AgNOR عبارت بودند از: الف) ۲ مورد داکت اکتازی: از ۳/۱۸ تا ۵/۲۴ (متوسط=۴/۲۱)، ب) ۳ مورد ژنیکوماستی: از ۳/۲۶ تا ۳/۹۲ (متوسط=۳/۵۶)، ج) ۱۹ مورد فیبروآدنوما: از ۳/۲۷ تا ۵/۴۶ (متوسط=۴/۵۱)، د) ۲۰ مورد بیماری فیبروکیستیک: از ۲/۸۷ تا ۴/۹۶ (متوسط=۳/۸۶)، ه) ۴۵ مورد کارسینوم مجرای می‌باشند: از ۷/۹۲ تا ۱۱/۹۸ (متوسط=۹/۸۲).

بحث

براساس onewayANOVA-test با (Pvalue<۰/۰۰۰)، اندکس AgNOR هر یک از ضایعات خوش‌خیم ذکر شده در بالا با کارسینوم مجرای می‌باشند تفاوت آماری واضح داشت (جدولهای شماره ۱ و ۲).

جدول شماره ۱- مقایسه موارد خوش خیم با کارسینوم مجرای (بدخیم) از نظر آماری

فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگین								
N	میانگین	انحراف معیار	اشتباهات	حد مینیمم	حد ماکزیمم	حداقل	حداکثر	
۲	۴/۲۱۰۰	۱/۴۵۶۶	۱/۰۳۰۰	-۸/۸۷۷۴	۱۷/۲۹۷۴	۳/۱۸	۵/۲۴	داکت اکتازیا
۳	۳/۵۶۰۰	۰/۳۳۴۱	۰/۱۹۲۹	۲/۷۳۰۱	۴/۳۸۹۹	۳/۲۶	۳/۹۲	ژنیکوماستی
۱۹	۴/۵۱۳۷	۰/۵۱۰۸	۰/۱۱۷۲	۴/۲۶۷۵	۴/۷۵۹۹	۳/۲۷	۵/۴۶	فیبروآدنوما
۲۱	۳/۸۶۱۴	۰/۶۶۷۲	۰/۱۴۵۶	۳/۵۵۷۷	۴/۱۶۵۲	۲/۸۷	۴/۹۶	بیماری فیبروکیستیک
۴۵	۹/۸۲۶۰	۰/۹۳۹۴	۰/۱۴۰۰	۹/۵۴۳۸	۱۰/۱۰۸۲	۷/۹۲	۱۱/۹۸	بدخیم
۹۰	۶/۹۷۹۱	۲/۹۷۸۴	۰/۳۱۴۰	۶/۳۵۵۳	۷/۶۰۲۹	۲/۸۷	۱۱/۹۸	جمع کل

جدول شماره ۲- استاندارد نتایج تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA)

مجموع مجزورات	درجه آزادی (df)	میانگین مجزورات	آزمون (F)	معنی دار بودن (Sig.)
بین گروهها (Between Groups)	۴	۷۳۴/۷۲۹	۲۸۵/۰۴۵	۰/۰۰۰
بدون گروهها (Within Groups)	۸۵	۵۴/۷۷۴		
جمع کل	۸۹	۷۸۹/۵۰۳		

$Pvalue < 0.004$ (جدولهای شماره ۶ و ۷) بین فیبروآدنوما و بیماری فیبروکیستیک اختلاف آماری معنی داری وجود داشت.

بر اساس t-test (جدولهای شماره ۳، ۴ و ۵) (با $Pvalue < 0.000$) اختلاف آماری واضحی بین اندکس AgNOR گروه بدخیم و خوش خیم وجود داشت و نیز براساس Kruskal Wallis-test، Chi square با

جدول شماره ۳- T-test برای تمایز بین ضایعات خوش خیم و بدخیم

تشخیص	تعداد	میانگین	انحراف معیار	انحراف میانگین
بدخیم	۴۵	۹/۸۲۶۰	۹۳۹۴	۰/۱۴۰۰
خوش خیم	۴۵	۴/۱۳۲۲	۶۹۴۹	۰/۱۰۳۶

جدول شماره ۴- نمونه های آزمون استقلال

آزمون T برای تساوی میانگین با						آزمون لون			
فاصله اطمینان ۹۵٪ برای اختلاف میانگینها	Std.Error Difference	اختلاف میانگین	آزمون مقایسه ای	درجه آزادی	آزمون	معنی دار	آزمون	فرض تساوی واریانسها	عدم فرض تساوی واریانسها
Upper	Lower								
۶/۰۳۹۹	۵/۳۴۷۶	۰/۱۷۴۲	۵/۶۹۳۸	۰/۰۰۰	۸۸	۳۲/۶۸۸	۰/۰۶۳	۳/۵۵۷	فرض تساوی واریانسها
۶/۰۴۰۳	۵/۳۴۷۲	۰/۱۷۴۲	۵/۶۹۳۸	۰/۰۰۰	۸۱/۰۵۵	۳۲/۶۸۸			عدم فرض تساوی واریانسها

جدول شماره ۵- بررسی نمونه‌های خوش‌خیم و بدخیم از نظر میزان AgNOR

توده (Mass)	میانگین	انحراف معیار	میان	۹۷٪ فاصله اطمینان	حداقل	حداکثر
خوش‌خیم	۴/۱۳	+۰/۶۹	۴/۲۰	۲/۷۲-۵/۵۴	۲/۸۷	۵/۴۶
بدخیم	۹/۸۲	+۰/۹۳	۹/۷۸	۷/۹۶-۱۱/۷۰	۷/۹۲	۱۱/۹۸

پیشنهادهات

۱- با توجه به ساده و ارزان بودن رنگ‌آمیزی AgNOR، می‌توان یکی از لام‌های تهیه شده از Frozen section، Touch imprint، FNA و یا بلوکهای پارافینی را با این روش رنگ‌آمیزی نمود تا براحتی ضایعات خوش‌خیمی مثل آدنوز اسکلروزان، میکروگلاندولار آدنوزیس و غیره را از بدخیمی افتراق داد. ۲- با توجه به مطالعات انجام شده با رنگ‌آمیزی AgNOR می‌توان مرحله (stage) بیماری را حدس زد. هر چه اندکس AgNOR بالاتر باشد، مرحله بیماری بالاتر است. ۳- با رنگ‌آمیزی AgNOR می‌توان پیش‌آگهی بیماری و نیز میزان بقای بیمار را پیش‌بینی کرد که اندکس AgNOR بالا با پیش‌آگهی بد و میزان بقای کم همراه است. ۴- جهت حذف خطای مشاهده‌گر بهتر است از Computerized Image Analysis استفاده شود.

منابع

- 1- Silverberg S., "Surgical Pathology and cytopathology", 3 rd ed, USA, churchill Livingstone, 1997, PP: 575- 674.
- 2- Sternberg S., "Dignostic surgical pathology", 3 rd ed., USA., lippincott Williams, 1999, PP: 319-387.
- 3- Rosai J., Ackerman's surgical pathology, 8 th ed., USA., Mosby 1995, PP: 1565- 1660.
- 4- Robbins S., "Pathologic Basis of Disease" 6 th ed., USA., Saunders., 1999., PP: 1093-1119.
- 5- Mourad W., "The Argyrophilic Nucleolar organizer in Ductal carcinoma insitu of the Breast", Cancer, 1994, 74: 2320- 2327.
- 6- Rath L., Wolfson S., "Nucleolar organized Regions in Breast cytology", Acta cytologic, 1995, Vol: 852-905.
- 7- Subramanian S., "AgNOR and their relationship of cell size, Histological Grade, lymph Node involvement, metastases and survival pattern in carcinoma of the Breast", Journal of surgical oncology, 1996, 62:139-143.

جدولهای شماره ۷- تست Kruskal-Wallis برای تمایز

بین فیبروآدنوما و ضایعات فیبروکیستیک

تشخیص	تعداد	ترتیب میانگین
۳	۱۹	۲۶/۰۸
۴	۲۱	۱۵/۴۵
تعداد کل	۴۰	

آزمون آماری (Test Statisticsa)

Chi-Square (توزیع کای)	۸/۲۴۸
Df (درجه آزادی)	۱
Asymp. Sig. (مقدار P)	۰/۰۰۴
اختلاف معنی‌دار میانگین با	a۰/۰۰۴

در انتها اندکس AgNOR به دست آمده از این مطالعه با اندکس AgNOR مطالعات دیگر مقایسه شده است.

جدول شماره ۸- متوسط نقاط AgNOR در ضایعات مختلف

پستان در مطالعات چاپ شده

Author	خوش‌خیم	بدخیم
Smith*	۵/۶+۱/۵	۱۳/۳+۳/۹
Giri*	۲/۸+۰/۴	۴/۴+۱/۲
Dervan*	۴/۹+۱/۳	۱۳/۷+۵/۲
Raymond ⁺	۲/۱+۰/۶	۵/۵+۲/۳
Moural ⁺	-	۳+۰/۶
Giri ⁺	۱/۹+۰/۳	۴/۲+۱/۲
M.Meehan*	۴/۴+۲	۹/۵+۲/۲
My study*	۴/۱۳+۱/۳	۹/۸+۲/۹

+ اعداد کوچکتر زمانی که محقق فقط coarse AgNOR را می‌شمارد به دست می‌آیند.

* اعداد بزرگتر زمانی که محقق هم fine و هم coarse AgNOR را می‌شمارد به دست می‌آیند.

THE COMPARISON EVALUATION OF AgNOR INDEX IN THE MALIGNANT AND BENIGN BREAST MASSES

^I
*M. Kadivar, MD ^{II}
A.M. Shafiee, MD

ABSTRACT

Nucleolar organizer regions (NORs) are loops of DNA included ribosomal genes that ribosomal RNA translated of it, which synthesis proteins. NORs are in short arms of acrocentric chromosomes and associated with argyrophilic proteins, which are seen as black dots, termed "AgNOR", by using colloidal silver (Ag) staining method. AgNOR count in nucleous have direct relation with cellular proliferative activity. The significance of this study is to evaluate the potential value of AgNOR in differentiating benign from malignant lesions, particularly, on the slide prepared from small biopsy, Frozen section, FNA and touch imprint, that are difficult to definite diagnosis by routine H&E staining. In this study, AgNOR stained on 90 section of paraffin embedded blocks included, 45 benign lesions and 45 malignant lesions. The average number of NORs in benign lesion and malignant tumor were 4.13 and 9.82 respectively. By using t-test and one way ANOVA-test, significant statistical difference is between benign and malignant lesions, so AgNOR staining is a simple, rapid and cheap method in definite diagnosis of benign from malignant breast lesions.

Key Words: 1) Nucleolar organizer regions (NOR) 2) AgNOR Staining Method

3) Benign lesion of breast 4) Malignant lesion of breast

This article is the summary of the degree of specialty in pathology of A.M.Shafiee, MD under supervision of M.Kadivar, MD, 2001.

*I) Assistant professor of pathology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran. (*Corresponding author)*

II) Resident of pathology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.